

Diss. ETH No. 17707

# Binding and Functional Studies on New Plant-derived CB<sub>2</sub> Receptor-selective Cannabinomimetics

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Dr. sc. ETH Zurich

presented by  
STEFAN ANDREAS RADUNER

Dipl. Pharm. ETH  
born 01.11.1976

Citizen of St. Gallen (Switzerland)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, examiner  
Prof. Dr. Michael Detmar, co-examiner  
Dr. Jürg Gertsch, co-examiner

Zurich, 2008

## SUMMARY

Cannabinoid type-1 (CB<sub>1</sub>) and cannabinoid type-2 (CB<sub>2</sub>) receptors belong to the G protein-coupled receptor family and are the primary targets of the endogenous cannabinoids *N*-arachidonylethanolamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG). Whereas CB<sub>1</sub> receptors are abundant in the central nervous system, CB<sub>2</sub> receptor expression is highest in immune tissues and immune cells. However, a strict separation of cannabinoid receptors into central (CB<sub>1</sub>) and peripheral (CB<sub>2</sub>) receptors is not adequate, since immune cells express also CB<sub>1</sub> receptors and CB<sub>2</sub> receptors have been found in the central nervous system. Activation of CB<sub>2</sub> receptors has been shown to trigger signalling pathways and mediate physiological effects, which are similar to those observed for CB<sub>1</sub>. However, in contrast to CB<sub>1</sub>-receptors, CB<sub>2</sub> receptors are not involved in mediating central nervous related psychotropic effects. The CB<sub>2</sub> receptor appears to play an important role in the pathophysiology of distinct diseases, like inflammatory bowel disease, atherosclerosis, inflammatory pain, osteoporosis but also in neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease and multiple sclerosis. In this context it is interesting to note that *N*-alkyl amides from *Echinacea* have been shown to modulate tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) expression in monocytes in a CB<sub>2</sub> receptor-dependent way.<sup>1</sup>

*Echinacea* preparations, used for the prevention and treatment of the common cold, are among the best selling herbal remedies in the United States and Europe and represent approximately 10% of the whole herbal-medicines market.<sup>2, 3</sup> Results from clinical trials on the benefit of *Echinacea* preparations for the prevention and treatment of the common cold are conflicting, among others because the composition of the products investigated varying significantly. Therefore, knowledge about the molecular targets and the compound(s) responsible for the immunomodulatory effects of *Echinacea* is crucial for both the interpretation of clinical trial data as well as the and standardization of *Echinacea* products.

In this thesis we could show that certain *N*-alkyl amides bind to the CB<sub>2</sub> receptor with nM affinities and a high degree of selectivity. Molecular modelling suggests that *N*-alkyl amides bind in the solvent accessible cavity in CB<sub>2</sub>, directed by H-bonding and  $\pi$ - $\pi$  interactions. To investigate the functional consequences of the *N*-alkyl amides upon receptor binding we measured intracellular Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) transients in promyelotic HL60 cells. Like the endocannabinoid 2-AG the binding *N*-alkyl amides induce a partially CB<sub>2</sub> receptor-dependent elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Furthermore, *N*-alkyl amides and AEA potently modulate cytokine expression in human whole blood. Even at low nM concentrations they significantly inhibit the LPS-induced expression of pro-inflammatory proteins, like TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-12. Moreover,

*N*-alkyl amides elevated TH<sub>2</sub>-cytokines upon stimulation with CD28 antibody, whereas CD3 antibody-induced cytokine expression was downregulated. The finding that *N*-alkyl amides from *Echinacea* bind to CB<sub>2</sub> receptors with  $K_i$  values in a concentration range that is also achievable *in vivo*<sup>4-6</sup> provides a first insight into a possible molecular mechanism of action of *N*-alkyl amide-containing *Echinacea* preparations.

*N*-alkyl amides are amphiphilic lipids and may thus aggregate in an aqueous environment. We have shown here that several members of this group of compounds self-assemble and form micelles and supermicelles. We have also provided evidence that the formation of micelles can influence results obtained in *in vitro* assays, such that aggregating *N*-alkyl amides show a biphasic binding curve in radioligand binding.

A series of *N*-alkyl amide derivatives was synthesized for preliminary structure-activity-relationships (SAR) studies, with the aim to better understand the CB<sub>2</sub> receptor binding-interactions of this new class of cannabinomimetics. Based on this study, *N*-alkyl amides bind to the CB<sub>2</sub> receptor in a different mode than AEA. In addition, some of these analogs interact with enzymes involved in the breakdown of endocannabinoids, like the AEA-transporter or the fatty acid amide hydrolase. We found two *N*-alkyl amides which inhibit the cellular uptake of AEA with an EC<sub>50</sub> comparable to that of the established AEA-transport inhibitor UCM707.

Since the discovery of the CB<sub>2</sub> receptor, a number of selective synthetic ligands have been developed. In contrast, the cannabinoids from *Cannabis sativa*, as well as endogenous cannabinoids which had been the only natural CB-ligands described so far, all bind to CB receptors in a non-selective fashion and thus are associated with undesirable CB<sub>1</sub> receptor-dependent central nervous effects like dizziness, impairment of memory, disorientation and nausea. With the objective of finding new plant-derived CB<sub>2</sub>-ligands, a screening of a plant-extract library has been conducted. 9 out of 128 extracts displaced the radioligand [<sup>3</sup>H]CP55,940 from the CB<sub>2</sub> receptor to an extent of over 70% at a concentration of 10 µg/ml. Bio-guided fractionation afforded (*E*)-β-caryophyllene as a new CB<sub>2</sub> receptor-selective ligand with nM affinity. Furthermore, (*E*)-β-caryophyllene induces [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and inhibits forskolin-stimulated cAMP production and, thus, can be considered as a full agonist of the CB<sub>2</sub> receptor. Since up to 35% of (*E*)-β-caryophyllene are present in the essential oil of *Cannabis sativa*, this natural product is likely to contribute to the overall effect of *Cannabis* preparations. (*E*)-β-caryophyllene is widespread in food plants and therefore could modulate inflammatory processes via the endocannabinoid system as a dietary factor.

Bio-guided fractionation of an extract of *Seseli* sp. nov., which displaced 81% of the radioligand from CB<sub>2</sub> and 63% from CB<sub>1</sub>, yielded the C<sub>17</sub>-polyacetylene falcarinol as a non-selective binder

for cannabinoid receptors. Since falcarinol is widespread in the Apiaceae family, it is possible that falcarinol is also responsible for the radioligand displacement observed in our screen with other extracts from this plant family.

Since the discovery that cannabinoids from *Cannabis sativa* L. bind and activate cannabinoid receptors, no other natural product class has been reported to mimic the effects of cannabinoids. We could now show that structurally different plant-derived compounds can act selectively on the CB<sub>2</sub> receptor. The discovery of new natural noncannabinoid CB<sub>2</sub> ligands could contribute to the development of more effective and selective drugs for diseases in which the CB<sub>2</sub> receptor is involved.

## ZUSAMMENFASSUNG

Cannabinoid Typ-1 (CB<sub>1</sub>) und Cannabinoid Typ-2 (CB<sub>2</sub>) Rezeptoren werden in die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren eingeteilt und sind Zielproteine der endogenen Cannabinoide *N*-Arachidonoyl ethanolamid (AEA) und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG). Während im zentralen Nervensystem eine hohe Dichte von CB<sub>1</sub> Rezeptoren gefunden wurde, ist die Expression von CB<sub>2</sub> Rezeptoren im Immungewebe und auf Immunzellen am höchsten. Eine strikte Trennung von Cannabinoid Rezeptoren in zentrale (CB<sub>1</sub>) und periphere (CB<sub>2</sub>) Rezeptoren ist jedoch nicht angemessen, da Immunzellen auch CB<sub>1</sub> Rezeptoren exprimieren und CB<sub>2</sub> Rezeptoren im zentralen Nervensystem gefunden wurden. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von CB<sub>2</sub> Rezeptoren Signalwege und physiologische Effekte auslöst, welche denjenigen die für CB<sub>1</sub> Rezeptoren beobachtet wurden, ähnlich sind. Im Gegensatz zu den CB<sub>1</sub> Rezeptoren sind CB<sub>2</sub> Rezeptoren in der Vermittlung von psychotropen Effekten im zentralen Nervensystem jedoch nicht involviert. Der CB<sub>2</sub> Rezeptor scheint eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie verschiedener Krankheiten, wie entzündlichen Darmerkrankungen, Arteriosklerose, entzündungsbedingten Schmerzen, Osteoporose, aber auch neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Multiple Sklerose, zu spielen. In diesem Zusammenhang ist es interessant anzumerken, dass *N*-Alkyl amide aus dem roten Sonnenhut (*Echinacea* spp.) die Expression von TNF- $\alpha$  in Monozyten CB<sub>2</sub> Rezeptor-abhängig modulieren.<sup>1</sup>

*Echinacea*-Präparate, die zur Prävention und Behandlung von Erkältungserkrankungen angewendet werden, gehören zu den bestverkauften pflanzlichen Heilmitteln in den USA und Europa und vertreten etwa 10% des gesamten Weltmarktes an pflanzlichen Arzneien.<sup>2, 3</sup> Resultate aus klinischen Studien, welche den Nutzen von *Echinacea*-Präparaten für die Prävention und Behandlung von Erkältungserkrankungen testen, sind widersprüchlich, unter anderem weil die chemische Zusammensetzung der Produkte stark variiert. Darum ist das Wissen über molekulare Zielstrukturen und Inhaltsstoffe, welche für die immunmodulierenden Effekte von *Echinacea* verantwortlich sind, wichtig für die Interpretation von klinischen Studien und die Standardisierung von *Echinacea*-Produkten.

In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass *N*-Alkyl amide aus *Echinacea* mit hohem Mass an Selektivität und Affinitäten im nM Konzentrationsbereich an den CB<sub>2</sub> Rezeptor binden. Daten von molekularem Modelling weisen darauf hin, dass *N*-Alkyl amide in die Lösungsmittel-erreichbare Kavität des CB<sub>2</sub> Rezeptors binden und H-Brücken sowie  $\pi$ - $\pi$  Interaktionen mit Aminosäureresten ausbilden. Um die funktionale Konsequenz der Interaktion der *N*-Alkyl amid mit dem CB<sub>2</sub> Rezeptor zu untersuchen, haben wir intrazelluläre Kalziumströme ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in

promyelotischen HL60 Zellen gemessen. Wie das Endocannabinoid 2-AG, induzierten die bindenden *N*-Alkyl amide eine teilweise CB<sub>2</sub>-abhängige Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Des Weiteren modulierten *N*-Alkyl amide und AEA die Expression von Zytokinen in menschlichem Vollblut sehr potent. Selbst bei tiefen nM Konzentrationen inhibierten sie die LPS-induzierte Expression von pro-inflammatorischen Proteinen, wie TNF-α, IL-1β und IL-12. Zudem erhöhten die *N*-Alkyl amide TH<sub>2</sub>-Zytokine nach Stimulation mit CD28 Antikörper, wobei die CD3 Antikörper-induzierte Zytokin-Expression herunterreguliert wurde. Die Erkenntnis, dass *N*-Alkyl amide aus *Echinacea* an den CB<sub>2</sub> Rezeptor binden, bei Konzentrationen welche auch *in vivo* erreicht werden,<sup>4,6</sup> liefert einen ersten Einblick in einen möglichen molekularen Wirkungsmechanismus von *N*-Alkylamid-haltigen *Echinacea*-Präparaten.

*N*-Alkyl amide sind amphiphile Lipide und könnten aufgrund dessen in einer wässrigen Umgebung aggregieren. In dieser Studie wurde gezeigt, dass gewisse *N*-Alkyl amide sich zu Mizellen und Supermizellen organisieren. Dies kann zur Folge haben, dass die Mizellenbildung Resultate aus *in vitro* Assays beeinflussen kann. So zeigten aggregierende *N*-Alkyl amide eine biphasische Bindungskurve im Radioliganden-Assay.

Eine Serie von *N*-Alkylamid-Derivaten wurde für eine preliminäre Struktur-Aktivitäts-Beziehungs-Studie synthetisiert, mit dem Ziel, die CB<sub>2</sub> Rezeptor Bindungsinteraktionen dieser neuen Klasse von Cannabinomimetika besser zu verstehen. Basierend auf dieser Studie binden *N*-Alkyl amide in einem von AEA verschiedenen Bindungs-Modus. Zusätzlich interagieren einige dieser Analoge mit Enzymen welche am Abbau von Endocannabinoiden beteiligt sind, wie das noch nicht klonierte AEA-Transporter-Protein oder die Fettsäureamid Hydrolase. Es wurden zwei synthetische *N*-Alkyl amide gefunden, welche die zelluläre Aufnahme von AEA mit einem EC<sub>50</sub> vergleichbar des etablierten AEA-Transport-Hemmer UCM707 hemmen.

Seit der Entdeckung des CB<sub>2</sub> Rezeptors wurden einige selektive synthetische Liganden entwickelt. Im Gegensatz dazu, binden die Cannabinoide aus *Cannabis sativa*, wie auch die endogenen Cannabinoide nicht selektiv an die Cannabinoid Rezeptoren und vermitteln darum auch unerwünschte CB<sub>1</sub> Rezeptor-abhängige Effekte, wie Schwindel, Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung, Desorientiertheit und Übelkeit. Mit dem Ziel neue CB<sub>2</sub>-Liganden aus Pflanzen zu finden, wurde eine Pflanzenextraktbibliothek gescreent. 9 von 128 Extrakten verdrängten, bei einer Konzentration von 10 µg/ml, den Radioliganden [<sup>3</sup>H]CP55,940 über 70% aus dem CB<sub>2</sub> Rezeptor. Aktivitätsgeleitete Fraktionierung brachte (*E*)-β-Caryophyllen als einen neuartigen CB<sub>2</sub>-Rezeptor-selektiven Liganden mit nM Affinität hervor. Des Weiteren induzierte (*E*)-β-Caryophyllen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und inhibierte Forskolin-stimulierte cAMP Produktion und kann darum als vollen CB<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist klassifiziert werden. Da der Gehalt an (*E*)-β-

Caryophyllen im ätherischen Oel von *Cannabis sativa* bis zu 35% erreichen kann, wird dieses Sesquiterpen einen Beitrag zum Gesamteffekt von *Cannabis*-Präparationen leisten. (*E*)- $\beta$ -Caryophyllen ist weit verbreitet in essbaren Pflanzen und könnte darum als ein Diät-Faktor Entzündungsprozesse über das Endocannabinoid System modulieren.

Aktivitätsgeleitete Fraktionierung eines *Seseli* sp. nov. Extrakts, welcher 81% des Radioliganden von dem CB<sub>2</sub> Rezeptor und 63% von dem CB<sub>1</sub> Rezeptor verdrängte, brachte das C<sub>17</sub>-Polyacetylen Falcarinol als nicht-selektiven Binder für Cannabinoid Rezeptoren hervor. Da Falcarinol in den Apiaceae weit verbreitet ist, wäre es möglich dass Falcarinol auch verantwortlich ist für die beobachtete Radioligand-Verdrängung von anderen Extrakten dieser Pflanzenfamilie in unserem Screen.

Seit der Entdeckung, dass Cannabinoide von *Cannabis sativa* an Cannabinoid Rezeptoren binden und diese aktivieren, wurde keine andere Naturstoffklasse beschrieben, welche die Effekte der Cannabinoide imitiert. Die Entdeckung von neuen natürlichen nicht-Cannabinoid CB<sub>2</sub> Liganden könnte zur Entwicklung von effektiveren und selektiveren Arzneimitteln gegen Krankheiten beitragen in welchen CB<sub>2</sub> Rezeptoren involviert sind.